Priprema ekstrakata lista kadulje (Salvia officinalis L.) i određivanje polifenolnih spojeva

Lučić, Dario

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:095966

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Dario Lučić

7330/N

PRIPREMA EKSTRAKATA LISTA KADULJE (*Salvia officinalis* L.) I ODREĐIVANJE POLIFENOLNIH SPOJEVA

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno istraživačkog projekta: Uspostavni istraživački projekt Hrvatske zaklade za znanost "Interakcije slatkovodnih patogenih oomiceta i okoliša" (InteractOomyc)

Mentor: doc. dr. sc. Maja Dent

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Priprema ekstrakata lista kadulje (*Salvia officinalis* L.) i određivanje polifenolnih spojeva

Dario Lučić, 0058209340

Sažetak: Ekstrakti kadulje zbog svog visokog udjela polifenolnih spojeva imaju potencijal primjene prirodnih inhibitora rasta oomicetnih patogena. Stoga, istraživan je utjecaj različitih vrsta otapala: voda, etanol (96%), etanol-voda (1:1), aceton (100%), aceton-voda (1:1), metanol (100%), metanol-voda (1:1), etanol-metanol-aceton (1:1:1) i etanol-metanol-aceton-voda (1:1:1:1) na ekstrakciju polifenolnih spojeva samonikle kadulje (*Salvia officinalis* L). Provedena je ekstrakcija refluksiranjem pri temperaturi ključanja otapala kroz 1 h i maceracija kroz 72 h te su spektrofotometrijskom metodom (UV/VIS) određeni maseni udjeli ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina, ukupnih flavonoida i flavonola. Neovisno o primijenjenom postupku ekstrakcije, kombinacijom otapala etanol-metanol-aceton-voda ekstrahiran je veći maseni udio ukupnih fenola (134,87 mg/g), hidroksicimetnih kiselina (66,08 mg/g) i flavonola (49,36 mg/g), dok se metanol pokazao najboljim za izolaciju flavonoida. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da se bolji učinak ekstrakcije polifenolnih spojeva postiže kombinacijom otapala, te dodatkom vode u otapalo, nego primjenom čistog otapala**.**

Ključne riječi: kadulja, ekstrakcija, maceracija, otapala, polifenoli
Rad sadrži: 41 stranica, 17 slika, 4 tablice, 65 literaturnih navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i električkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: doc. dr. sc. Maja Dent
Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Ana Bielen

Datum obrane: 10. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Nutrition

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analytical Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Preparation of sage extracts (*Salvia officinalis* L.) and determination of polyphenolic compounds

Dario Lučić, 0058209340

Abstract: Sage extract due to its high proportion of polyphenolic compounds has the potential to be used as a natural inhibitor for the growth of oomycete pathogens. Therefore, the influence of different types of solvents on the extraction of polyphenolic compounds of wild sage (*Salvia officinalis* L.) was investigated. Solvents used were: water, ethanol (96%), ethanol-water (1:1), acetone (100%), acetone-water (1:1), methanol (100%), methanol-water (1:1), ethanol-methanol-acetone (1:1:1) and ethanol-methanol-acetone-water (1:1:1:1). The extraction was performed by refluxing at the boiling temperature of the solvent for 1 h and by process of maceration for 72 h. By spectrophotometric method (UV/VIS) high levels of total phenols, hydroxycinnamic acid, total flavonoids, and flavonols were determined. Regardless of the extraction procedure used, the highest mass fraction of total phenols (134.87 mg/g), hydroxycinnamic acids (66.08 mg/g) and flavonols (49.36 mg/g) was extracted with the ethanol-methanol-acetone-water solvent combination, while methanol showed best for flavonoids isolation. Based on the obtained results, it can be concluded that the better effect of extraction of polyphenolic compounds is achieved by adding water to the solvent than using a pure solvent.

Keywords: sage, extraction, maceration, solvent, polyphenolic compounds
Thesis contains: 41 pages, 17 figures, 4 tables, 65 references
Original in: Croatian
Thesis is in printed and electronic form deposited in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: Maja Dent, assistant professor
Technical support and assistance: Ana Bielen, assistant professor

Defence date: September 10th 2018

SAŽETAK

1. UVOD **1**
2. TEORIJSKI DIO **2**
2.1. KADULJA (*Salvia officinalis* L.) 2
2.1.1. Osnovne karakteristike biljke 2
2.1.2. Geografska rasprostranjenost 3
2.1.3. Eterično ulje iz kadulje 4
2.2. Polifenolni spojevi 6
2.2.1. Fenolne kiseline 7
2.2.2. Flavonoidi 8
2.2.3. Polifenolni spojevi u kadulji 9
2.3. Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva 11
2.4. Metode ekstrakcije 13
2.4.1. Osnovni procesni parametri ekstrakcije 14
2.5. Spektrofotometrijske metode 16
2.6. Kromatografske metode 16
3. MATERIJALI I METODE **17**
3.1. Materijal 17
3.2. Kemikalije i standardi 17
3.3. Aparatura i pribor 17
3.4. Metode rada 18
3.4.1. Ekstrakcija refluksiranjem (Eksperiment A) 18
3.4.2. Maceracija (Eksperiment B) 19
3.4.3. Spektrofotometrijsko određivanje polifenolnih spojeva 20
3.4.3.1. Određivanje ukupnih fenola 20
3.4.3.2. Određivanje hidroksicimetnih kiselina 22
3.4.3.3. Određivanje flavonola 23
3.4.3.4. Određivanje ukupnih flavonoida 24
4. REZULTATI I RASPRAVA **27**
4.1. Spektrofotometrijsko određivanje masenih udjela polifenolnih spojeva 27
4.1.1. Ukupni fenoli 27
4.1.2. Hidroksicimetne kiseline 29
4.1.3. Flavonoli 30
4.1.4. Ukupni flavonoidi 32
4.1.5. Usporedba provedenih eksperimenata 33
5. ZAKLJUČAK **36**
6. LITERATURA **37**

1. UVOD

Kadulja (*Salvia officinalis* L.) jedna je od važnijih predstavnica ljekovitog bilja te se koristi više od 4000 godina za ljudsku prehranu, kao začin, ali i u medicinske svrhe, zbog svojih antimikrobnih, protuupalnih i drugih svojstava (Ghorbani i sur., 2016). Aromatska biljka je bogata biološki aktivnim spojevima koji se većim djelom nalaze u listu. Najveći postotak zastupljenosti čine fenolni spojevi, točnije hidroksicimetne kiseline i njezini derivati, među kojima dominantnu ulogu imaju derivati kafeinske kiseline, posebno ružmarinska kiselina. Fenolni spojevi su iznimno važni za rast i reprodukciju biljke, a istraživanja pokazuju i njihovo snažno antioksidativno djelovanje (Rice-Evans i sur., 1996). Na sastav i koncentraciju fenolnih spojeva kadulje utječu brojni čimbenici kao što su klimatski i ekološki uvjeti, sastav tla te blizina mora. Prvi i najvažniji korak izolacije fenolnih spojeva iz kadulje je ekstrakcija, a jedinstveni standardni postupak ekstrakcije ne postoji. Najčešće primjenjivana je klasična ekstrakcija uz primjenu organskih otapala, uz zagrijavanje kroz određeno vrijeme. Uobičajena otapala koja se koriste su etanol i metanol, ali i druga poput acetona, etil acetata, *n*-butanola, izopropanola te vode. Budući da dulje vrijeme ekstrakcije, veća potrošnja otapala i energije te rizik od degradacije termolabilnih fenolnih spojeva predstavljaju nedostatke takvih metoda, sve se više istražuju moderniji i ekološki prihvatljiviji postupci ekstrakcije, kao i primjena ekološki prihvatljivijih otapala.

Cilj ovog istraživanja je bio priprema ekstrakata lista kadulje, te usporedba ekstrakcijskog kapaciteta izolacije polifenolnih spojeva iz kadulje primjenom ekstrakcije refluksiranjem u odnosu na maceraciju. Također, cilj je bio usporediti primjenu različitih kombinacija ekstrakcijskih otapala koji će se koristiti tijekom priprave ekstrakata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KADULJA (*Salvia officinalis* L.)

2.1.1. Osnovne karakteristike biljke

Salvia officinalis L. pripada porodici Lamiaceae (usnače), podporodici Nepetoideae, tribusu Menthae, subtribusu Salviinae, rodu Salvia (Drew i Sytsma, 2012). Aromatsku biljku je prvi put opisao Carl Linné 1753. godine. Prethodno je razmatrana uglavnom zbog eteričnih ulja, a posljednjih nekoliko desetljeća ekstraktu kadulje su dokazana značajna antioksidativna i antimikrobna svojstva (Dent i sur., 2015; Dragović-Uzelac i sur., 2012). Biljka je poznata od davnina, a u antičko doba koristila se kao lijek za brojne bolesti. O ljekovitosti biljke govori i naziv roda Salvia, koji potječe od riječi „salvare", što znači spasiti ili iscijeliti. U narodu je kadulja poznata pod drugim nazivima kao što su kuš, pelim, slavulja ili žalfija. Tradicionalno se koristi kao biljni čaj i začin te kao miris u kozmetici, parfumeriji i farmaceutskoj industriji (Willfort, 2002).

a)

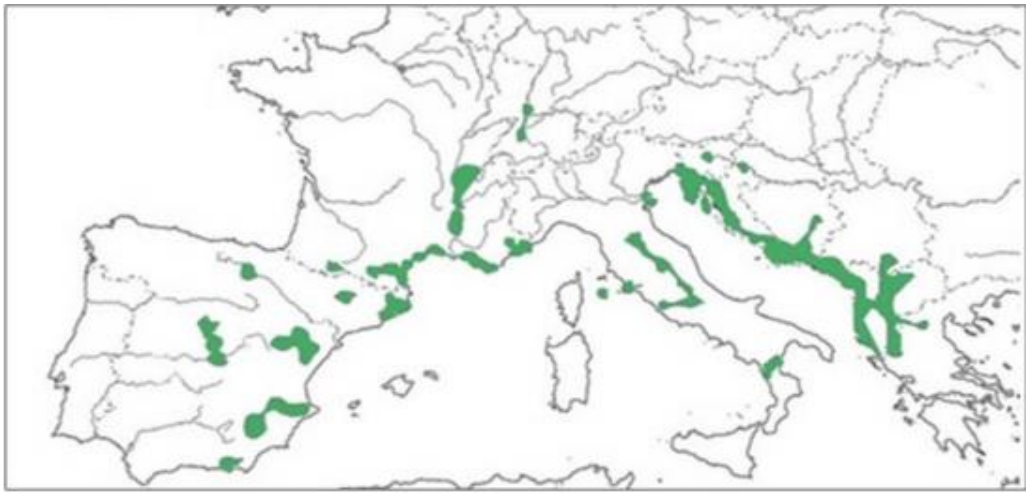
b)

Slika 1. Prikaz a) cvijeta i b) lista kadulje *Salvia officinalis* L. (Nikolić, 2015).

Kadulja je višegodišnja polugrmovita biljka mediteranskog porijekla. Sadrži nekoliko razgranatih stabljika koje izbijaju neposredno iz korijena, a može dosegnuti visinu i do 90 cm. Na dugim dršcima nalaze se srebrnozeleni listovi, fino naborani i s obje strane prekriveni dlačicama. Cvjetovi su dvospolni, jednodomni i veliki oko 2-3 cm. Ocvijeće je dvostruko, a čaška cjevasta i dvousnata. Vjenčić izgledom podsjeća na čašku, ali je barem dvostruko duži, plave ili ljubičaste boje. Cvjetovi su vrlo ugodna mirisa koji privlači pčele te je kadulja važna medonosna biljka (Trinajstić, 1992). Ima 2 prašnika, prirasla za cijev vjenčića, i jedan tučak s nadraslom plodnicom. Plod je kalavac, a dijeli se na male tamnosmeđe, glatke oraščiće. Kao samonikla biljka raširena je na našem priobalju i otocima, na kamenitom tlu, a uzgaja se u cijelom svijetu zbog izuzetno ljekovite vrijednosti (Umeljić, 2004).

2.1.2. Geografska rasprostranjenost

Rod *Salvia* najbrojniji je rod porodice Lamiaceae koji sadrži između 700 i 1000 vrsta i ima tri centra rasprostranjenja: centralna i južna Amerika, središnja i istočna Azija i Mediteran (Walker i sur. 2004). Prirodni areal ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.) prostire se duž sjevernog, srednjeg i južnog Jadrana i bližeg kontinentalnog područja, uključujući dijelove Slovenije, Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Crne gore i Albanije (Ristić i sur., 1999). Hrvatsko primorje, od otoka Krka i Cresa na sjeveru, do planine Biokova na jugu, čini središte rasprostranjenosti (Trinajstić, 1992). Pretpostavlja se da je pradomovina kadulje upravo Balkanski poluotok otkuda se dalje širila prema zapadnom Sredozemlju (Slika 2).



Slika 2. Rasprostranjenost ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.) na području Mediterana (Jantol i Kekić, 2013).

Ljekovita kadulja raste na nadmorskoj visini do 1000 m, otporna je na dugotrajne suše te je veoma važna jer svojim korijenom sprječava eroziju tla krškog područja. Od cijelog niza poznatih varijeteta, podvrsti, formi i subformi biljke kadulje, u Europi se po veličini, obliku i dlakavosti listova razlikuju tri podvrste: lavandulifolia, minor i major. Podvrsta lavandulifolia raste na Pirinejskom poluotoku, prepoznatljiva je po duguljastim i uskim listovima, cvjetovima na kratkim stapkama te karakterističnom mirisu koji podsjeća na ružmarin. Podvrsta minor rasprostranjena je na području srednjeg i zapadnog Sredozemlja, listovi su joj manje dlakavi, s dugim peteljkama i dužine do 7 cm.

Za naše područje karakteristična je podvrsta minor koja se može svrstati u tri tipa. Sjevernojadranski tip, prepoznatljiv je po uškastim liskama na peteljci, a raste na području Kvarnera. Srednjejadranski tip ili kadulju krstašicu karakteriziraju izduženi listovi, a raste na području Makarske. Južnojadranski tip ili primorska kadulja s relativno velikim listovima raste na području Dubrovačkog primorja i Stona. Podvrsta major raste na istočnom Mediteranu, u Maloj Aziji, Siriji i južnoj Rusiji, biljka je izgledom veća od prethodno opisane dvije podvrste (Kuštrak, 2005).

Ovisno o klimatskim uvjetima staništa, ljekovita kadulja cvijeta između ožujka i srpnja, a cvjetanje traje oko mjesec dana. Za vrijeme cvjetanja proizvodi veliku količinu nektara, što ju čini važnom medonosnom biljkom. Smatra se da je kadulju najbolje brati nakon cvatnje, u srpnju, jer je tada sadržaj tujona najveći. Kvaliteta eteričnog ulja i tržišna cijena kadulje proporcionalno rastu ovisno o količini prisutnog tujona. Klimatski uvjeti imaju veliki utjecaj i na udio tujona u kadulji, stoga se osobito vrijednom smatra kadulja s otoka Paga i Velebita, a naročito ona koja raste u unutrašnjosti u odnosu na onu koja raste u blizini mora (Kuštrak, 2005).

2.1.3. Eterično ulje iz kadulje

Dijelovi biljke, najčešće list kadulje se podvrgava operacijama sušenja i usitnjavanja te metodi ekstrakcije eteričnog ulja. Ulje je bistra, žućkasta do zelenožućkasta, lako hlapljiva tekućina, karakteristična mirisa i okusa, koja peče na jeziku. Ima dobru topljivost u lipofilnim otapalima, dok se slabo otapa u vodi. Štiti biljku od hladnoće i vrućine, a svojim mirisom privlači insekte i tjera biljojede. Glavni sastojci su lakohlapljivi monoterpeni: α- i β-tujon, 1,8-cineol, (+)-kamfor, borneol i bornil-acetat, te seskviterpeni: humulen, (-) kariofilen i viridiflorol. Osim terpena, u mješavinama se nalaze i fenolni spojevi, fenilpropani i spojevi sa sumporom. Kadulja (*Salvia officinalis* L.) s područja RH ima veći sadržaj eteričnog ulja od ostalih vrsta kadulje. Najveći udio eteričnog ulja nalazi se u listu kadulje, a sadržaj ulja je uvjetovan geografskim podrijetlom i ovisi o mjesecu kada je kadulja ubrana. Nešto manji udio eteričnog ulja zastupljen je u cvijetu, a najmanje u stabljici kadulje (Kuštrak, 2005).

2.1.4. Djelovanje i uporaba kadulje

Kadulja spada u najstarije medicinske biljke, a čajevi i pripravci od kadulje koriste se još od grčkih i rimskih vremena zbog svojih protuupalnih, fungicidnih, baktericidnih, virucidnih i gastroprotektivnih svojstava (Greguraš, 2013). Aromatični listovi kadulje, osim što su bogati sekundarnim biljnim metabolitima, fenolnim kiselinama, flavonoidima, diterpenima i triterpenima, sadrže i eterično ulje (Wang i sur., 1998). U fitofarmaciji, kadulja ima vanjsku i unutarnju primjenu. Za vanjsku primjenu, koriste se tinkture, infuzije ili ekstrakti kadulje za ispiranje usne šupljine kod upala i angine. Za unutarnju primjenu, kadulja se najčešće rabi u obliku čaja za želučane i crijevne tegobe, kod opeklina, opušta grčeve te smanjuje znojenje. Već spomenuti α-tujon najzastupljenija je komponenta s udjelom od 50% u stabljici, 30% u listovima i 18% u cvijetu. Zbog visokog sadržaja toksičnog tujona, kadulja se mora uzimati u manjim i određenim količinama. U suprotnom, visoke doze tujona mogu uzrokovati grčeve, epileptični napad, halucinacije, depresiju i zastoje disanja. Osim uporabe u fitofarmaciji, značajna je uporaba kadulje kao začina. Dodaje se u mesne i riblje konzerve zbog svoje uloge prirodnog konzervansa. Zbog estrogenskog djelovanja koristi se i pri tegobama mjesečnog ciklusa ili za prestanak izlučivanja mlijeka. Provedena su i istraživanja koja pokazuju pozitivan učinak kaduljina lista na kognitivne funkcije i raspoloženje kod zdravih mladih pojedinaca i kod starijih pacijenata s blagom do umjerenom Alzheimerovom bolesti (Perry i sur., 2003). Med od kadulje se u Hrvatskoj proizvodi u malim količinama zbog relativno ograničenih klimatskih uvjeta i specifičnih zahtjeva za podlogom. Ljekovitosti meda, ali i same kadulje, pridonosi sadržaj polifenolnih sastojaka koji imaju antioksidativni učinak. Osim ljekovite uloge, biljka ima i ukrasnu vrijednost i nerijetko se sadi u vrtovima zbog mirisa, privlačnih listova i izgleda, a uz to nije zahtjevna za održavanje. Primjena eteričnih ulja vrlo je rasprostranjena i obuhvaća područje kozmetičke industrije, prehrambene industrije, medicine, farmakologije i fitopatologije. Ono se rabi u proizvodnji sredstava za njegu kose, kože, zubiju te u proizvodnji sapuna, parfema, losiona i deterdženata. Korištenje eteričnih ulja kao antimikrobnih sredstava u kozmetičkoj industriji nije toliko raširenо jer su ta antimikrobna svojstva blaga, za razliku od nekih uobičajenih sredstava koja se inače koriste. Govorimo li o očuvanju zdravlja, eterična ulja se oduvijek koriste u liječenju bolesti te za poboljšavanje raspoloženja i koncentracije. Utječu na fizičko, emocionalno, duhovno i mentalno stanje ljudi, odnosno na mozak, posebice hipotalamus i limbički sustav. Eterično ulje kadulje zbog svog snažnog antimikrobnog učinka ima sve veći potencijal primjene kao dodatka u konzerviranoj i pakiranoj hrani, juhama, mesu, kobasicama i dr. (Bouaziz i sur., 2009).

Eterično ulje kadulje inhibira bakterije usne šupljine, kao što su obvezatni anaerobi (*Fusobacterium nucleatum, Peptostreptococcus anaerobius i Porphyromonas gingivalis*) i mikroaerofili (*Actinobacillus actinomycetemcomitans, Capnocytophaga spp. i Eikenella corrodens*). Fakultativni anaerobi bakterija usne šupljine (*Actinomyces viscosus, Strepococcus sanguis, Streptococcus sobrinus*) manje su osjetljivi na eterično ulje kadulje (Shapiro i sur., 1994). Istraživanja su pokazala da je eterično ulje kadulje učinkovito i protiv rasta bakterija *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium linens*, *Micrococcus luteus* i *Seratia marcescens* (Deans and Ritchie, 1987).

2.2. Polifenolni spojevi

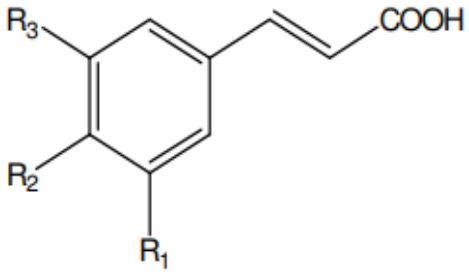
Prilikom rasta i razvoja, biljka proizvodi brojne primarne i sekundarne metabolite koji omogućavaju njezin opstanak i komunikaciju s okolinom (Kliebenstein i Osboum, 2012). U primarne metabolite ubrajaju se tvari nastale neposrednom pretvorbom, npr. šećeri. Polifenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti bioaktivnih značajki prisutni u velikom broju biljaka. Imaju zaštitnu ulogu već u samoj biljci zbog antioksidacijskog i antimikrobnog djelovanja, a štite biljku i od UV zračenja. Međusobno se razlikuju po strukturi, od jednostavnih koji sadrže hidroksilirani aromatski prsten sve do polimeriziranih spojeva (Spanos i Wrolstad, 1992). Prema kemijskoj strukturi dijele se na fenolne kiseline i flavonoide.

Polifenoli se sintetiziraju iz dva glavna biosintetska puta: put šikiminske kiseline i acetatni put (acilpolimalonatni put). Šikiminska kiselina je univerzalni prekursor u biosintezi aromatskih aminokiselina u mikroorganizmima (bakterijama, gljivicama) i višim biljkama, ali ne i u životinjskim organizmima (Vladimir Knežević, 2008; Bravo, 1998). Polifenoli spadaju u skupinu spojeva koji su jedni od glavnih nositelja senzorskih osobina hrane, a sve se više istraživanja bavi njihovim brojnim pozitivnim učincima na ukupan organizam. Ljekovito bilje poznato je kao dobar izvor biološki aktivnih supstanci koje značajno povećavaju unos antioksidansa putem hrane (Dragland i sur., 2003). Dnevno se prehranom unese oko 1 g polifenola, što je mnogo više od unosa ostalih poznatih antioksidansa. Glavni izvor polifenola u prehrani je voće te u manjoj mjeri povrće, suhe mahunarke i žitarice, a od pića su to vino, čaj, kava i pivo (Scalbert i Williamson, 2000). Dugotrajna konzumacija hrane i pića bogatih polifenolima smanjuje rizik od razvoja tumora, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, osteoporoze i neurodegenerativnih bolesti (Pandey i Rizvi, 2009).

2.2.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline čine oko trećinu fenolnih spojeva prisutnih u biljkama, a prisutne su u slobodnom ili vezanom obliku. Manji se broj fenolnih kiselina javlja u slobodnom obliku, dok su većinom u biljkama prisutne konjugirane (ponajviše esterifikacijom) sa strukturnim biljnim dijelovima (celulozom, proteinima i ligninom) ili s različitim molekulama, uključujući jednostavne šećere i organske kiseline (Vuković, 2013). Dijele se na dvije podskupine: hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline te njihovi derivati (Bravo, 1998). Hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline razlikuju se u stupnju hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena (Macheix i sur., 1990).

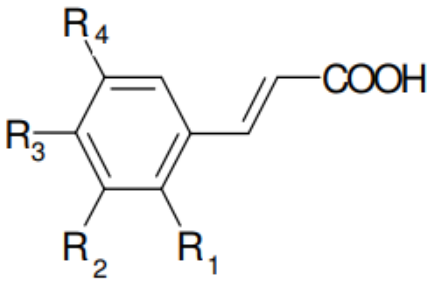
Hidroksibenzojeve kiseline su derivati benzojeve kiseline, obično prisutne u slobodnom obliku ili u obliku konjugiranih šećera, estera i organskih kiselina. U ovu skupinu kiselina se ubrajaju galna, protokatehinska, vanilinska, siringinska, gentistinska i elaginska kiselina. Hidroksibenzojeve kiseline mogu nastati izravno između produkata puta šikiminske kiseline, međutim u biljkama češće nastaju degradacijom derivata cimetne kiseline (Russell i sur., 1999).



HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE
Galna R_1=R_2=R_3=OH
Protokatehinska R_1=H; R_2=R_3=OH
Siringinska R_2=OH; R_1=R3=OCH_3
Vanilinska R_1=H; R_2=OH; R_3=OCH_3

Slika 3. Kemijska struktura hidroksibenzojevih kiselina (Robards i sur., 1999)

Hidroksicimetne kiseline su derivati fenilpropanoida i predstavljaju važne građevne jedinice mnogih drugih prirodnih spojeva. U skupinu takvih kiselina se ubrajaju kafeinska kiselina, najzastupljenija u biljnom svijetu, te kumarinska, ferulinska i sinapinska kiselina. Obično su prisutne u konjugiranim oblicima ili u obliku specifičnih estera, kao npr. klorogenska kiselina i ružmarinska kiselina (Ralph i sur., 1994; Russell i sur., 1999).



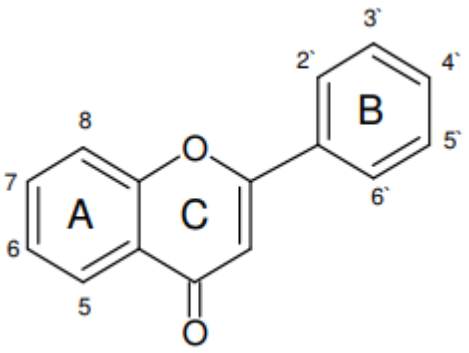
HIDROKSICIMETNE KISELINE
Kava R_1=R_2=H; R_3=R_4=OH
Ferulinska R_1=R_2=H;R_3=OH;R_4=OCH_3
p-kumarinska R_1=R_2=R_4=H; R_3=OH
Sinapinska R_1=H; R_3=OH;R_2=R_4=OCH_3

Slika 4. Kemijska struktura hidroksicimetnih kiselina (Robards i sur., 1990)

2.2.2. Flavonoidi

Flavonoidi su druga velika skupina sekundarnih biljnih polifenola karakteriziranih flavanskom jezgrom. Identificirano je više od 6400 flavonoida (Harborne i Baxter, 1999). Osnovnu strukturu čini difenilpropan odnosno dva benzenska prstena (A i B) povezana piranskim prstenom (C) koji ima vezan kisik (Slika 5). Flavonoidi koji su zastupljeni u hrani razlikuju se po broju i položaju hidroksilnih, metoksilnih i glikozidnih skupina te po konjugaciji između dva benzenska prstena. Također, flavonoidi se međusobno razlikuju prema stupnju oksidacije centralnog piranskog prstena. U biljkama su najčešće prisutni u obliku 3-O-glikozida ili polimera.

Pronađeno je više od 80 različitih vrsta šećera vezanih na molekule flavonoida i to: 10 monosaharida, 39 disaharida, 30 trisaharida i jedan tetrasaharid. Glikozilacija flavonoida uglavnom se događa na položaju 3-, a rjeđe na položaju 7-. Najčešći šećer je D-glukoza, no javljaju se i D-galaktoza, L-ramnoza, D-ksiloza, L-arabinoza te neki disaharidi kao što je rutinoza (Miller 1996). Nastajanje flavonoida u biljkama uvjetovano je brojnim faktorima kao što su svijetlost, uvjeti okoliša, genetika biljke, stupanj zrelosti i vrsta biljke (Fruhbeck, 1996).



Slika 5. Osnovna struktura flavonoida (Macheix i sur., 1990)

U flavonoide se ubrajaju: flavoni (apigenin, luteolin, tangeretin), flavanoni (naringenin, hesperitin), flavanoli (katehin, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin), flavonoli (kamferol, kvercetin, miricetin), flavanonoli (taksifolin), procijanidini (teaflavin, B1, B2, A2, C1), antocijani (delfidin, cijanidin, malvidin, petunidin, peonidin, pelargonidin), izoflavoni (daidzein, genistein), čalkoni (floretin, ksantohumol), neoflavonoidi (dalbergin) (Tsao 2010).
Neke skupine flavonoida su neobojene (npr. flavononi), dok drugi članovi skupine (npr. antocijani) daju boje voću i cvijeću i poznati su kao pigmenti.

Flavonoidi su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu, od alga do kritosjemenjača. Sastavni su dio gotovo svih viših biljaka, a najviše ih ima u mladim listovima, cvjetnim pupoljcima i nezrelim plodovima. Hidrofilni flavonoidi nalaze se otopljeni u staničnom soku vakuola, dok se lipofilni flavonoidi (tetra-, penta- i heksametoksilirani) javljaju u idioblastima i ekskretornim stanicama (Vladimir, 1993).

Flavonoli i flavoni slične su strukture, imaju nezasićenu vezu između C_2 i C_3 atoma C prstena, a razlikuju se u tome što flavonoli imaju hidroksilnu skupinu vezanu na C_3 atomu C prstena dok flavoni nemaju. Glavni predstavnici flavonola su: kvercetin, kamferol, miricetin i izomiricetin.

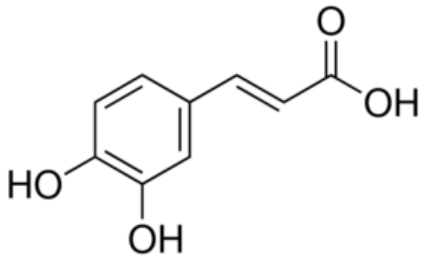
2.2.3. Polifenolni spojevi u kadulji

Kadulja je bogata biološki aktivnim komponentama, a udio polifenola razlikuje se ovisno o dijelu godine u kojem se provodi berba (Generalić, 2012). Prosječan udio polifenola u kadulji u svibnju iznosi 41% ekstrakta, dok u ostalom dijelu godine iznosi 22-30% (Generalić i sur., 2011). Dijelovi biljke iznad zemlje pretežno sadrže flavonoide i triterpene kao i eterična ulja sa hlapljivim sastojcima, kao što su monoterpeni. Diterpeni su glavni sastojci korijena.

Antioksidativni učinak kadulje pripisuje se prisustvu ružmarinske kiseline i flavonoida, koji se uglavnom javljaju kao flavoni i njihovi glikozidi. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz biljaka vrlo je važan korak u izolaciji, identifikaciji i uporabi polifenola (Dragović Uzelac i sur., 2012).

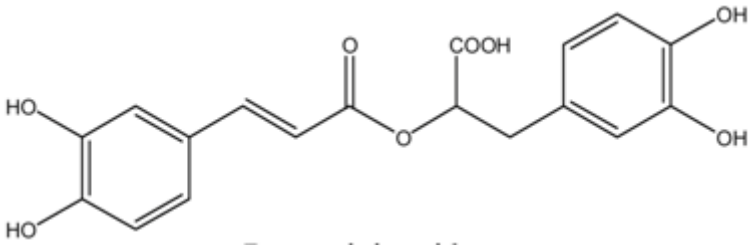
U rodu Salvia od hidroksibenzojevih kiselina zastupljene su: 4-hidroksibenzojeva kiselina, 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina (protokatehinska), 3-metoksi-4-hidroksibenzojeva kiselina (vanilinska) i 2,4-dimetoksibenzojeva kiselina.

Uz navedene fenolne kiseline u kadulji dominiraju hidroksicimetne kiseline i to derivati kafeinske kiseline, a to su ružmarinska i litosperminska kiselina, te salvianolna kiselina i izosalvianolna kiselina. Glavnina fenolnih kiselina odnosi se na kafeinsku kiselinu (Slika 6.) i njezine derivate koji sudjeluju u metabolizmu biljke (Kametou i sur., 2010). Od trimera kafeinske kiseline u kadulji se nalaze melitriska kiselina A, metil melitrat A, sagekumarin i salvianolna kiselina K i I (Lu i sur.,1999). Kafeinska kiselina, u slobodnom obliku i u obliku estera, najzastupljenija je fenolna kiselina te čini između 75% i 100% ukupnog sadržaja fenolnih 20 kiselina kod većine voća. Kafeinska kiselina pokazuje veliku antioksidacijsku aktivnost, *in vitro* i *in vivo* hepatoprotektivno, protuvirusno, protuupalno djelovanje, a u kombinaciji s ružmarinskom kiselinom i antimikrobno djelovanje.



Slika 6. Kemijska struktura kafeinske kiseline (Robards i sur., 1999)

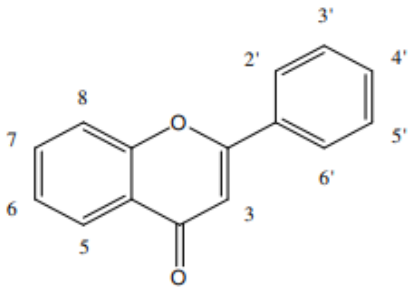
Zastupljenost derivata hidroksicimetne kiseline u kaduljinom listu je 3,5%, a najveći udio čini dimer kafeinske kiseline, ružmarinska kiselina. Struktura se sastoji od dva polifenolna prstena s hidroksilnom grupom u orto položaju (Slika 7).



Slika 7. Kemijska struktura ružmarinske kiseline (Robards i sur., 1999)

Ružmarinska kiselina je ester kafeinske kiseline i 3,4-dihidroksifenillaktične kiseline. Između dva prstena nalaze se karboksilna i karbonilna grupa. Poznati su brojni derivati ružmarinske kiseline kao i produkti koji sadrže jednu ili više ružmarinskih kiselina uz dodatak neke druge aromatske kiseline. Budući da je ružmarinska kiselina značajno prisutna i u drugim aromatskim biljkama, osim u kadulji, nije pogodna za upotrebu kao kemotaksonomični marker. Posjeduje brojne biološke funkcije poput inhibicije HIV-1, antitumornu i antihepatitičku te protektivnu ulogu. Uz dimere, u kadulji su prisutni trimeri kafeinske kiseline i tetrameri, odnosno dimeri ružmarinske kiseline (sagerinska kiselina i salvianolna kiselina L) (Petersen i Simmens, 2003).

U kadulji je prisutno oko 1,1% flavonoida, prije svega flavoni i njihovi glikozidi: luteolini njegovi 7-glukozid, 7-glukunorid, 3-glukunorid i 7-metilni eter; 6-hidroksiluteolin, njegov 7-glukozid i 7-glukuronid; 6-metoksiluteolin i njegov 7-metilni eter; luteolin 6,8-di-C-glukozid (vicenin-2); apigenin, njegov 7-glukozid i 7-metilni eter (genkvanin); apigenin 6,8-di-C-glukozid; 6-hidroksiapigenin; 6-metoksiapigenin (hispidulin) i njegov 7-metilni eter (cirsimaritin); metoksisalvigenin i kvercitin 3-glikozid (Tamas i sur., 1986).



FLAVONI
Apigenin 5=7=4'=OH
Luteolin 5=7=3'=4'=OH

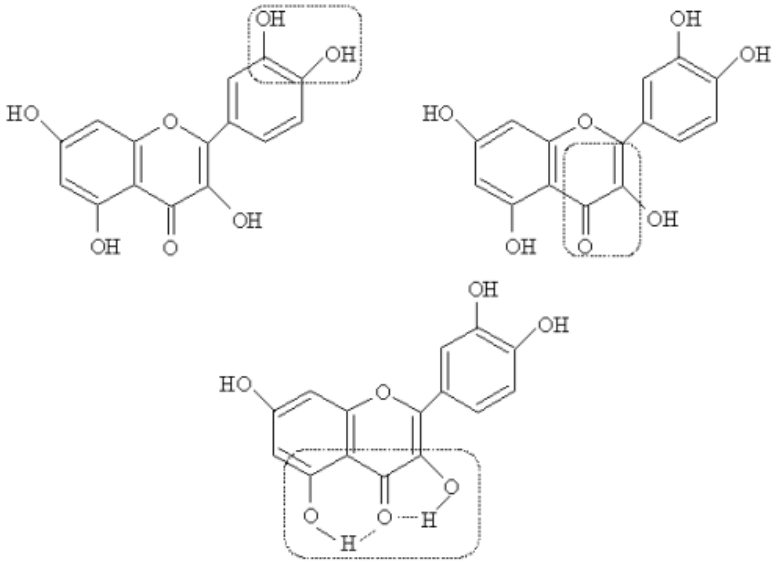
Slika 8. Kemijska struktura flavona (Robards i sur., 1999)

Fenolni glikozidi koji se nalaze u kadulji su picein (4-hidroksiacetofenon 4-glukozid), *cis-p*-kumarinska kiselina 4-(2'-apiosil)-glukozid i *trans-p*-kumarinska kiselina 4-(2'- apiosil)-glukozid, izolaricirezinol 3-glukozid, 1-hidroksipinorezinol 1-glukozid i drugi (Lu i Foo,2000).

2.3. Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva

Antioksidacijska aktivnost kadulje pripisuje se zastupljenosti fenolnih kiselina i položaju hidroksilnih skupina unutar molekule. Uvođenjem druge hidroksilne grupe u položaj *ortho* ili *para* te dodatno uvođenjem jedne ili dvije metoksi skupine u *ortho* položaj obzirom na hidroksilnu skupinu, povećava se antioksidacijska aktivnost (Dewick, 2002).

Zbog sposobnosti doniranja vodikova atoma te na taj način hvatanja slobodnih radikala generiranih u reakciji peroksidacije lipida, flavonoidi također služe kao antioksidanti. Radikali se stabiliziraju delokalizacijom elektrona, stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza ili daljnjom reakcijom s drugim lipidnim radikalom (Halliwell i sur., 1995). Za hvatanje slobodnih radikala važne su sljedeće skupine flavonoida: *o*-hidroksilna struktura u B prstenu koja daje stabilnost radikalu i omogućuje delokalizaciju elektrona, zatim 2,3-dvostruka veza u konjugaciji s 4-keto-skupinom, što omogućuje delokalizaciju elektrona iz B prstena te hidroksilne skupine na položaju 3 i 5 koje osiguravaju vodikovu vezu s keto-skupinom (Slika 9).



Slika 9. Strukturne skupine važne za hvatanje slobodnih radikala (Halliwell i sur., 1995)

Aglikoni su snažniji antioksidanti od odgovarajućih glikozida. Porastom broja glikozidnih skupina flavonskih glikozida smanjuje se antioksidacijska aktivnost na koju ima utjecaj prisutnost, položaj i broj glikozidnih skupina te struktura šećera. U kadulji su od flavonoida koji pokazuju antioksidacijska svojstva zastupljeni glikozidi apigenina i luteolina (Lu i Foo, 2001).

2.4. Metode ekstrakcije

Ekstrakcija je postupak potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topivost u različitim otapalima. Za postizanje maksimalnog ekstrakcijskog kapaciteta potrebno je obratiti pozornost na prirodu biljnog materijala, ali i prirodu samih spojeva. Lipofilnost ili hidrofilnost spojeva ima značajan utjecaj na njihovu topljivost u otapalu, a isto tako polarnost otapala utječe na efikasnost ekstrakcije. Prisustvo kisika, svjetla i enzimska aktivnost biljaka također su faktori koji utječu na ekstrakcijski kapacitet izazivajući oksidaciju, hidrolizu ili izomerizaciju. Dakle, odabir ekstrakcijske metode određen je prirodom biološki aktivnih spojeva. Ovisi o svojstvima pojedinih dijelova (listovi, sjemenke, cvjetovi i plodovi) biljnog materijala, kao i o vrsti i strukturi bioaktivnih komponenta u biljnom matriksu. Da bi ekstrakcija bila što učinkovitija, potrebno je odabrati otapalo koje će uz ostale osnovne procesne parametre (temperatura, vrijeme kontakta, veličina čestica i pH) utjecati na selektivnu izolaciju analita. Većina razvijenih ekstrakcijskih tehnika za izolaciju biološki aktivnih spojeva bazirana je na upotrebi organskih otapala, vode, ukapljenih plinova ili njihove kombinacije. Najčešće korištena otapala za ekstrakciju polifenolnih spojeva su voda, etanol (96%), metanol i aceton (Robards i Antolovich, 1997) te etil-acetat, dietil-eter, metanol ili vodena otopina metanola koji su pogodni za ekstrakciju fenolnih kiselina. Topljivost polifenolnih spojeva određena je njihovom kemijskom strukturom, a ovisi o interakcijama s drugim spojevima u biljci, kao što su ugljikohidrati, proteini, karotenoidi itd. Problem koji se javlja prilikom navedenih interakcija je pojava poprilično netopljivih spojeva. Upravo zbog toga, vrlo je važno odabrati pogodno otapalo za ekstrakciju, odrediti vrijeme ekstrakcije koje može trajati od 1 minute do 24 sata te određenim postupcima ukloniti nefenolne spojeve (terpene, voskove, masti itd.) koji bi ometali daljnju analizu. Neprikladno, predugo vrijeme ekstrakcije povećava mogućnost oksidacije polifenola, osim u slučaju dodatka reducirajućih tvari.

Najčešće korišteno otapalo za ekstrakciju polifenola je vodena otopina metanola, s udjelom metanola od 50 do 80%, zbog svog visokog ekstrakcijskog kapaciteta. Veći udio vode u otapalu pogoduje ekstrakciji glikozida fenolnih spojeva, a za ekstrakciju njihovih aglikona potrebno je provesti hidrolizu. Pri izolaciji bioaktivnih komponenata iz biljnog materijala mogu se koristiti različite ekstrakcijske tehnike, a podijeljene su u dvije osnovne grupe, klasične ili konvencionalne i nove, suvremene ili nekonvencionalne. Klasične metode kao što su Soxhlet ekstrakcija, destilacija ili maceracija, temelje se na topljivosti tvari u različitim otapalima, zagrijavanju i miješanju.

Tehnološkim postupkom maceracije moguće je ekstrahirati biološki aktivne spojeve ljekovitog i aromatskog bilja, voća ili plodova u vodeno-alkoholnoj bazi (destilatu ili etilnom alkoholu) pri sobnoj temperaturi. Glavni nedostaci klasičnih metoda su dugo vrijeme ekstrakcije, potreba za skupim otapalima, visoke čistoće, isparavanje velikih količina otapala, niska selektivnost i termička razgradnja termolabilnih spojeva. U cilju skraćivanja vremena ekstrakcije, snižavanja temperature, smanjenja korištenja otapala štetnih za okoliš, snižavanja troškova procesa i istovremenog postizanja veće efikasnosti ekstrakcije, uvedene su i nove, nekonvencionalne tehnike ekstrakcije (Azmir i sur., 2013).

Metode ekstrakcije otapalima temelje se na miješanju uzorka s prikladnim otapalom i/ili prevođenju uzorka u dvofazni sustav sastavljen od dva ili više otapala koja su međusobno slabo topljiva (Dai i Mumper, 2010).

2.4.1. Osnovni procesni parametri ekstrakcije

Ekstrakcijsko otapalo: Pregledom literature vidljivo je da aceton, metanol i etanol (vodene otopine u različitim omjerima organske faze otapala) imaju utjecaj na izolaciju polifenolnih spojeva kako iz kadulje tako i drugih biljaka.

FDA preporuča upotrebu manje toksičnih otapala kao što su etanol, n-butanol i izopropanol (Bartnick i sur., 2006) u ekstrakciji bioaktivnih spojeva iz biljnog materijala, iako se prema istraživanjima nekih autora primjenom metanola ekstrahiraju veći udjeli fenolnih spojeva (Ma i sur., 2009). Primjenom metanola kao otapala moguće je ekstrahirati oko 20 % više fenolnih spojeva nego etanolom (Kapasakalidis i sur., 2006), dok primjenom etanola u odnosu na vodu 73 % više (Castañeda-Ovando i sur., 2009). U industrijskim razmjerima za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala više se koristi etanol ili vodene otopine etanola, zbog manje toksičnosti (Ignat i sur., 2011; Bimakr i sur., 2011). Organsko otapalo koje se koristi za ekstrakciju iz biljaka trebalo bi zadovoljavati slijedeće karakteristike (Albu i sur., 2004): točka ključanja bi trebala biti niska kako bi se olakšalo uklanjanje otapala iz ekstrakta, otapalo ne bi smjelo kemijski reagirati s ekstraktom, niti se lako razgraditi, viskoznost mora biti niska, stabilnost na toplinu, kisik i svjetlo visoka, a otapalo bi trebalo biti nezapaljivo, netoksično za okolinu i ekološki prihvatljivo te dostupno u značajnim količinama.

Upotreba etanola kao otapala za ekstrakciju fenolnih spojeva je korištena u širokom rasponu koncentracija tj. od 20 do 100 % (Areias i sur., 2000; Durling i sur., 2007; Dent i sur., 2013), a metanola u rasponu koncentracija od 50 do 100 % (Jerman i sur., 2010; Klen i Vodopivec, 2012). Wang i sur. (2004) proveli su ekstrakciju primijenivši 30-60% vodene otopine etanola, dok su Areias i sur. (2000) istraživanje proveli primjenom 30-80% vodene otopine etanola. Fecka i Turek (2008) proveli su ekstrakciju fenolnih spojeva iz aromatskog bilja vodenom otopinom metanola (70%).

Voda je univerzalno otapalo koje se koristi za izdvajanje biljnih metabolita iz ljekovitih biljnih vrsta. Budući da su polifenoli u biljnim tkivima često vezani na proteine i polisaharide vodikovim i hidrofobnim vezama, otapalo za ekstrakciju takvih spojeva treba imati sposobnost cijepanja veza. Upravo zbog toga je učinak ekstrakcije vodenim otapalom manji nego primjenom organskih otapala (Miralai i sur., 2007).

Ako se ekstrakti ljekovitih biljaka koriste za ljudsku upotrebu, primjena otapala za ekstrakciju propisana je posebnim zakonskim propisima.

Vrijeme i temperatura ekstrakcije: su parametri koji se moraju optimizirati prije samog početka ekstrakcije kako bi ona bila što efikasnija. Povećanjem temperature dolazi do povećanja topljivosti otopine i koeficijenta difuzije, što posljedično dovodi do poboljšanja učinkovitosti ekstrakcije. Kod ekstrakcije polifenolnih spojeva treba obratiti pozornost na njihovu stabilnost jer dugotrajna ekstrakcija i visoke temperature uzrokuju njihovu toplinsku razgradnju te gubitak aktivnosti, pa je i udio polifenola u konačnom ekstraktu smanjen.

Veličina čestica i pH vrijednost: Na udio polifenola ekstrahiranih iz biljnog materijala bitno utječe i različita veličina čestica uzorka. Veličina čestica mora biti ograničena jer zbog izuzetno malih čestica, koje obično imaju tendenciju spojiti se u aglomerate, dolazi do smanjenja prodiranja otapala u biljni materijal, što negativno utječe na postupak prijenosa tvari. Stoga se prijenos tvari iz biljaka može poboljšati korištenjem manjih čestica i povećanjem brzine ekstrakcije polifenola (Takeuchi i sur., 2009).

2.5. Spektrofotometrijske metode

Spektrofotometrija (UV/VIS) je najčešće korištena metoda za određivanje različitih skupina polifenola zbog svoje jednostavnosti korištenja i niskih troškova, stoga su razvijeni mnogi spektrofotometrijski postupci za određivanje fenolnih spojeva. Glavni nedostatak je što se na ovaj način mogu odrediti samo pojedine skupine polifenola, ali ne i udio pojedinačnih spojeva u istoj skupini. Iz tog razloga razvijene su različite kromatografske tehnike, prikladne za određivanje i separaciju polifenola.

2.6. Kromatografske metode

Kromatografija je analitička metoda kojom se smjesa spojeva rastavlja na sastavne komponente na principu raspodjele između stacionarne i mobilne faze. Tijekom kromatografskog ispitivanja uzorak se nalazi u dinamičkoj ravnoteži između tih dviju faza. Nepokretna faza se mora odabrati tako da vrijeme zadržavanja molekula u njoj bude selektivno tj. da različiti sastojci smjese budu uz nju različito dugo vezani. Parametri kromatografskog razdvajanja su vrijeme zadržavanja, protok kroz porozni medij i širenje kromatografske zone.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

Korišteni su listići samonikle kadulje (*Salvia officinalis* L.), ubrani na području Dalmacije (Pirovac) u srpnju 2017. godine. Listići su osušeni te skladišteni, a neposredno prije provođenja analize i usitnjeni.

3.2. Kemikalije i standardi

Kemikalije za postupke ekstrakcije

- 96 %-tna vodena otopina etanola; Gram-mol (Hrvatska)
- 100 %-tni metanol; Gram-mol (Hrvatska)
- 100 %-tni aceton; Kemika (Hrvatska)
- Deionizirana voda

Kemikalije i standardi za spektrofotometrijsko određivanje

- Folin-Ciocalteu reagens; Gram-mol (Hrvatska)
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20%, *w/v*), Na_2CO_3; Gram-mol (Hrvatska)
- 96 %-tna vodena otopina etanola; Gram-mol (Hrvatska)
- Otopina aluminijeva klorida (10%, *w/v*), $AlCl_3$; Gram-mol (Hrvatska)
- Otopina kalijevog acetata, 1 M, CH_3CO_2K; Gram-mol (Hrvatska)
- Koncentrirana klorovodična kiselina, 37 %-tna; Gram-mol (Hrvatska)
- Standard kafeinske kiseline; Acros Organics (New Jersey, USA)
- Standard kvercetina; Acros Organics (New Jersey, USA)
- Standard galne kiseline; Merck KGaA (Darmstadt, Germany)

3.3. Aparatura i pribor

- Analitička vaga (Tehničar Servag, Zagreb, Hrvatska)
- UV/VIS Spektrofotometar (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, SAD)
- Magnetski mješač (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- Vortex (Labo Moderne, Paris, France)

3.4. Metode rada

Iz lista kadulje su postupcima ekstrakcije refluksiranjem i maceracije dobiveni ekstrakti u kojima se potom spektrofotometrijski određivao maseni udio polifenolnih spojeva, pri različitim valnim duljinama.

3.4.1. Ekstrakcija refluksiranjem (Eksperiment A)

Odvaže se 1 g uzorka s točnošću ± 0,01 prethodno usitnjenih listića biljke u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 100 mL, te se doda 25 mL ekstrakcijskog otapala. Sadržaj tikvice se dobro promiješa, tikvica se stavi na magnetsku miješalicu, stavi se magnet i uključi miješanje, a temperatura se podesi na temperaturu ključanja otapala. Na tikvicu se stavi vodeno hladilo i uključi se voda. Kada sadržaj unutar tikvice počne ključati mjeri se vrijeme ekstrakcije 1 h. Po završetku ekstrakcije sadržaj tikvice se ohladi pod mlazom hladne vode te se dobiveni ekstrakt profiltrira preko lijevka i filter papira (Papir crna vrpca Munktell 125 mm/388, Filtrak, Germany) u odmjernu tikvicu od 25 mL, a nakon toga sadržaj tikvice nadopuni se do oznake otapalom korištenim za ekstrakciju. Ekstrakt se prebaci u plastičnu kivetu, i ekstrakti se čuvaju na hladnom i tamnom mjestu, pri temperaturi -18°C do provođenja analiza.

Slika 10. Ekstrakcija refluksiranjem pri temperaturi ključanja otapala

Otapala:

- Voda
- Etanol (96%)
- Etanol-voda (1:1)
- Aceton (100%)
- Aceton-voda (1:1)
- Metanol (100%)
- Metanol-voda (1:1)
- Etanol-metanol-aceton (1:1:1)
- Etanol-metanol-aceton-voda (1:1:1:1)

3.4.2. Maceracija (Eksperiment B)

Odvaže se 1 g uzorka s točnošću ± 0,01 prethodno usitnjenih listića biljke u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 100 mL, te se doda 25 mL ekstrakcijskog otapala u kojem se uzorak natapa 72 h (Slika 11). Po završetku maceracije sadržaj tikvice se profiltrira preko lijevka i filter papira u odmjernu tikvicu od 25 mL, a nakon toga nadopuni do oznake korištenim otapalom (Slika 12).

Slika 11. Maceracija uzorka u otapalu

Slika 12. Filtracija preko lijevka i filter papira

3.4.3. Spektrofotometrijsko određivanje polifenolnih spojeva

Ukupni fenoli, hidroksicimetne kiseline, flavonoli i ukupni flavonoidi određivani su spektrofotometrijski u prethodno pripremljenim ekstraktima kadulje dobivenim postupcima ekstrakcije refluksiranjem i maceracije.

3.4.3.1. Određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli se određuju spektrofotometrijski pri čemu se metoda temelji se na kolornoj reakciji fenola s Folin-Chiocalteu reagensom, te mjerenjem nastalog plavog obojenja pri 765 nm (Singleton i Rossi 1965). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolmrafove i fosfomolibdene kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima ove kiseline se reduciraju u volmframov oksid i molibdenov oksid koji su plave boje. Redukcija ovih kiselina odnosno tvorba relativno stabilnog plavo obojenog kompleksa bit će intenzivnija što je prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u fenolnim spojevima.

Reakcija fenola s Folin-Chiocalteu reagensom:

$$Na_2WO_4/Na_2MoO_4 + \text{Fenol} \rightarrow (\text{fenol-}MoW_{11}O_{40})^{4-}$$

$$\text{Mo (VI)} + e^- \rightarrow \text{Mo (V)}$$

<u>Izrada baždarnog dijagrama galne kiseline</u>

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se standardna otopina galne kiseline, masene koncentracije 5 g/L. Od te otopine galne kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da se koncentracije standardnih otopina galne kiseline iznose 50, 100, 150, 250, 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 125 µL otopine standarda u staklene epruvete. Potom se dodaje redom 625 µL Folin-Cioalteu reagensa i 10 mL deionizirane vode. Nakon 3 minute doda se 1,9 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri T= 50°C u vodenoj kupelji. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrta se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 765 nm o masenoj koncentraciji galne kiseline (mg L^{-1}).

Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar
- Staklene kivete
- Analitička vaga
- Mikropipeta 100 i 1000 µL
- Pipete, volumena 1 mL, 2 mL
- Odmjerne tikvice, volumena 100mL (6 komada) i 1000 mL

Kemikalije:

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
  F.C. reagens se razrijedi s deioniziranom vodom u omjeru 1:2
- Zasićena otopina natrijeva karbonata (20%, *w/v*), Na_2CO_3
  200 g anhidrida natrijeva karbonata se otopi u 800 mL vruće deionizirane vode, ohladi na sobnu temperaturu i doda nekoliko kristalića natrijeva karbonata, nadopuni vodom u odmjernoj tikvici od 1000 mL i nakon 24 h filtrira kako bi se dobila zasićena otopina natrijeva karbonata (20%-tna otopina).
- Standard galne kiseline
  Odvaže se 250 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 5 ml 96%-tnog etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 50 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni deioniziranom vodom.

Postupak određivanja ukupnih fenola

Alikvot od 125 µL ekstrakta kadulje (prethodno razrijeđenog) otpipetira se u staklenu epruvetu, potom se doda 625 µL Folin-Cioalteu reagensa i 10 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1,9 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve skupa se promiješa pomoću Vortexa, a potom se uzorci termostatiraju 25 minuta pri T= 50°C u vodenoj kupelji. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Maseni udjeli ukupnih fenola izraženi su kao ekvivalent galne kiseline mg GAE g^{-1} suhog lista kadulje.

3.4.3.2. Određivanje hidroksicimetnih kiselina

Hidroksicimetne kiseline se određuje mjerenjem intenziteta nastalog obojenja pri 320 nm (Howard i sur., 2003).

Izrada baždarnog pravca kafeinske kiseline

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se standardna otopina kafeinske kiseline, masene koncentracije 100 mg/L. Iz alikvota otopine standarda 100 mg/L pripreme se razrjeđenja kiseline tako da koncentracije standardnih otopina kafeinske kiseline iznose: 10, 25, 50 i 66,7 mg/L. Također, za analizu se uzima i alikvotna otopina standarda koncentracije 100 mg/L. U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL otopine standarda, 250 µL 1g/L HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2g/L HCl. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrta se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 320 nm o masenoj koncentraciji kafeinske kiseline (mg L^{-1}).

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar
2. Staklene epruvete
3. Analitička vaga
4. Mikropipete i pipete volumena 5 mL
5. Odmjerne tikvice volumena 10 mL i 100 mL
6. Plastična lađica za vaganje

Kemikalije:

- Koncentrirana klorovodična kiselina, 37%
- Etanol, 96%
- Klorovodična otopina masene koncentracije 1 g/L HCl (u 96% etanolu)
  Otopina se priprema na način da se 0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni 96% etanolom do oznake.
- Klorovodična otopina masene koncentracije 2 g/L HCl
  Otopina se dobije se tako da se 0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni deioniziranom vodom do oznake.

- Standard kafeinske kiseline (100 mg/L)
  Odvaže se 5 mg standarda kafeinske kiseline, te se pomoću 2,5 mL 80%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 50 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni 80%-tnim metanolom.

Postupak određivanja hidroksicimetnih kiselina

Alikvot od 250 µL ekstrakta kadulje (prethodno razrijeđenog) otpipetira se u staklenu epruvetu, potom se doda 250 µL 1 g/L HCl (u 96% etanolu) i 4,55 mL 2 g/L HCl. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 320 nm. Kvantifikacija ukupnih hidroksicimetnih kiselina provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kafeinsku kiselinu. Maseni udjeli hidroksicimetnih kiselina izražavaju se kao ekvivalent kafeinske kiseline (mg CAE g^{-1} suhog lista kadulje).

3.4.3.3. Određivanje flavonola

Određivanje flavonola se provodi spektrofotometrijskom metodom pri čemu se intenzitet nastalog obojenja mjeri pri 360 nm (Howard i sur., 2003).

Izrada baždarnog pravca kvercetina

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se standardna otopina kvercetina, masene koncentracije 100 mg L^{-1}. Iz alikvota otopine standarda 100 mg L^{-1} pripreme se razrjeđenja tako da koncentracije standardnih otopina kvercetina iznose:: 2.5, 5, 10, 25 i 50 mg L^{-1}. Također, za analizu se uzima i alikvotna otopina standarda koncentracije 100 mgL^{-1}. U staklenu epruvetu otpipetira se redom 250 µL otopine standarda, 250 µL 1g/L HCl u 96% etanolu i 4,55 mL 2g/L HCl. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrta se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 360 nm o masenoj koncentraciji kvercetina (mg L^{-1}).

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar
2. Staklene epruvete
3. Analitička vaga
4. Mikropipete i pipete volumena 5 mL
5. Odmjerne tikvice volumena 10 mL i 100 mL
6. Plastična lađica za vaganje

Kemikalije:

- Koncentrirana klorovodična kiselina, 37%
- Etanol, 96%
- Klorovodična otopina masene koncentracije 1 g/L HCl (u 96% etanolu)
  Otopina se priprema na način da se 0,227 mL koncentrirane klorovodične kiseline (37%) otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni 96% etanolom do oznake.
- Klorovodična otopina masene koncentracije 2 g/L HCl
  Otopina se dobije se tako da se 0,454 mL koncentrirane klorovodične kiseline otpipetira u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopuni deioniziranom vodom do oznake.
- Standard kvercetina (100 mg L^{-1})
  Odvaže se 5 mg standarda kvercetina, te se pomoću 2.5 mL 100%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 50 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni 100%-tnim metanolom

Postupak određivanja flavonola

Alikvot od 250 µL ekstrakta kadulje (prethodno razrijeđenog) otpipetira se u staklenu epruvetu, potom se doda 250 µL 1 g/L HCl (u 96% etanolu) i 4,55 mL 2 g/L HCl. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini 360 nm. Kvantifikacija flavonola provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kvercetin. Maseni udjeli flavonola izražavaju se kao ekvivalent kvercetina (mg QE g^{-1} suhog lista kadulje).

3.4.3.4. Određivanje ukupnih flavonoida

Ukupni flavonoidi se određuju metodom koja se temelji na kolornoj reakciji flavonoida s aluminijevim kloridom i kalijevim acetatom te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja spektrofotometrijski pri 415 nm (Chang i sur., 2002).

Izrada baždarnog pravca kvercetina

Za pripremu baždarnog pravca pripremi se standardna otopina kvercetina, masene koncentracije 100 mg L^{-1}. Iz alikvota otopine standarda 100 mg L^{-1} pripreme se razrjeđenja tako da koncentracije standardnih otopina kvercetina iznose:: 10, 25, 50 i 75 mg L^{-1}. Također, za analizu se uzima i alikvotna otopina standarda koncentracije 100 mg L^{-1}. U staklenu epruvetu otpipetira se redom 0.5 mL prethodno razrijeđenog ekstrakta, 1.5 mL 96%-tnog etanola, 0.1 mL 10%-tnog aluminijeva klorida, 0,1 mL 1 M kalijeva acetata i 2,8 ml deionizirane vode.

Na isti način pripremi se slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100%-tni metanol te se umjesto 10 %-tnog aluminijeva klorida dodaje isti volumen deionizirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega se izmjeri apsorbancija pri valnoj duljini 415 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrta se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 415 nm o masenoj koncentraciji kvercetina (mg L^{-1}).

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar
2. Staklene epruvete
3. Analitička vaga
4. Pipete, volumena 2 mL, 5 mL
5. Mikropipete od 100 i 1000 µL
6. Odmjerne tikvice, volumena 10 mL (4 kom) i 100 mL (1 kom)
7. Plastična lađica za vaganje

Kemikalije:

- Etanol, 96%-tni
- Metanol, 100%-tni
- Aluminijev klorid, 10%-tni
  10%-tni aluminijev klorid se priprema na način da se 1 g aluminijevog klorida (aluminij-klorid-heksahidrat, p.a.) otopi sa 5 mL deionizirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuni do oznake deioniziranom vodom.
- Kalijev acetat, 1 M
  Priprema 1 M kaliijevog acetata zahtjeva da se 9,845 g uzorka otopi u 10 mL deionizirane vode te kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni do oznake deioniziranom vodom.
- Standard kvercetina (100 mg L^{-1})
  Odvaže se 10 mg standarda kvercetina, te se pomoću 5 mL 100%-tnog metanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni 100%-tnim metanolom.

Postupak određivanja ukupnih flavonoida

Alikvot od 500 µL ekstrakta kadulje (prethodno razrijeđenog) otpipetira se u staklenu epruvetu, potom se doda 1.5 mL 96%-tnog etanola, 0.1 mL 10%-tnog aluminijeva klorida, 0,1 mL 1 M kalijeva acetata i 2,8 ml deionizirane vode. Na isti način pripremi se slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima 100%-tni metanol te se umjesto 10 %-tnog aluminijeva klorida dodaje isti volumen destilirane vode (0,1 mL). Reakcijska smjesa stoji potom 30 minuta, nakon čega se izmjeri apsorbancija pri valnoj duljini 415 nm. Kvantifikacija ukupnih flavonoida provodi se pomoću jednadžbe baždarnog pravca za kvercetin. Maseni udjeli ukupnih flavonoida izražavaju se kao ekvivalent kvercetina (mg QE g^{-1} suhog lista kadulje).

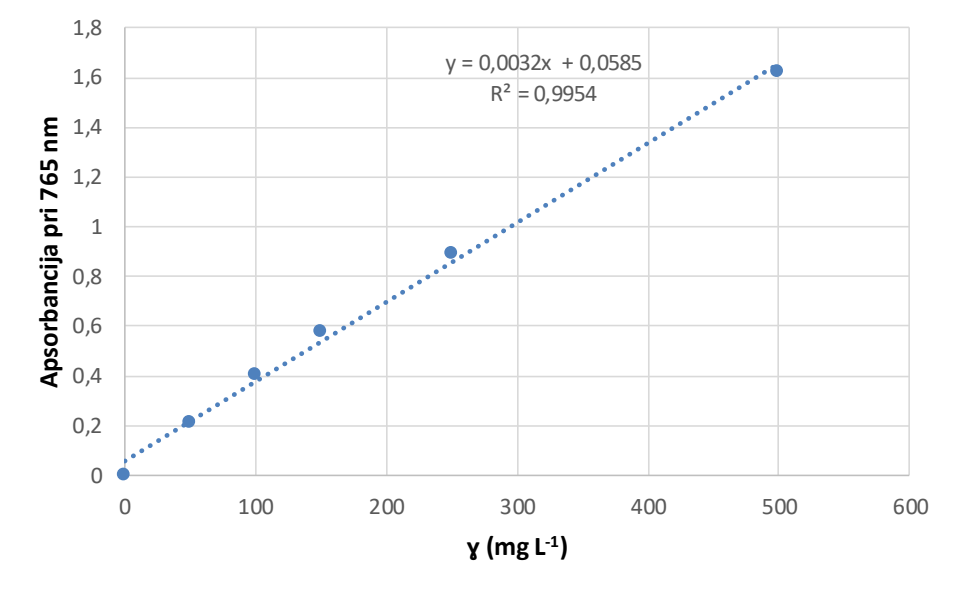
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu prikazani su rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola, flavonoida, hidroksicimetnih kiselina i flavonola u pripremljenim ekstraktima lista kadulje, upotrebom dviju ekstrakcijskih metoda: ekstrakcija refluksiranjem (Eksperiment A) i maceracija (Eksperiment B). Korištena otapala u obje metode ekstrakcije su: voda, etanol (96%), etanol-voda (1:1), aceton (100%), aceton-voda (1:1), metanol (100%), metanol-voda (1:1), etanol-metanol-aceton (1:1:1) i etanol-metanol-aceton-voda (1:1:1:1). Ekstrakcija refluksiranjem je provedena pri temperaturi ključanja otapala kroz 1 h, a maceracija natapanjem lista kadulje kroz 72 h na sobnoj temperaturi.

4.1. Spektrofotometrijsko određivanje masenih udjela polifenolnih spojeva

4.1.1. Ukupni fenoli

Za određivanje ukupnih fenola u pripremljenim ekstraktima kadulje potrebno je bilo izraditi baždarni dijagram. Na slici 13. prikazan je baždarni dijagram na kojem su prikazane masene koncentracije galne kiseline s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancije. Iz regresijskog pravca izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija, iz kojih su izračunati maseni udjeli ukupnih fenola (Tablica 1) u pripremljenim ekstraktima lista kadulje. Rezultati masenog udjela ukupnih fenola su izraženi kao mg galne kiseline na g suhog lista kadulje.



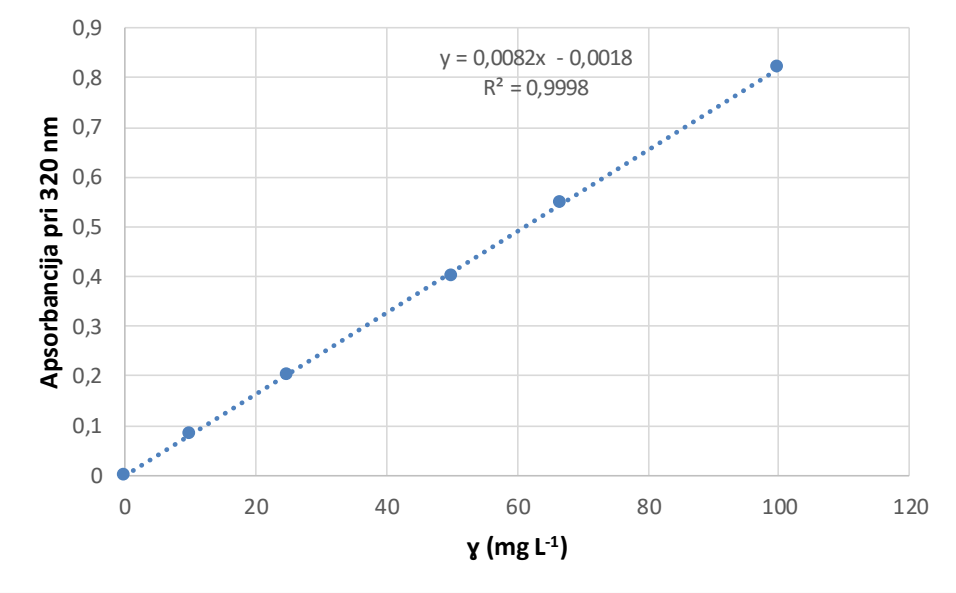
Slika 13. Baždarni dijagram galne kiseline

Tablica 1. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola dobivenih u oba eksperimenta prilikom uporabe određenog otapala (mg GAE/g ± SD)

OTAPALO	EKSPERIMENT A	EKSPERIMENT B
	w (mg GAE/g) ± SD	
Voda	87,45 ± 2,09	32,34 ± 3,99
Etanol	63,26 ± 3,07	35,51 ± 1,68
Etanol-Voda	114,70 ± 5,15	79,22 ± 4,32
Aceton	35,82 ± 0,93	22,89 ± 1,50
Aceton-Voda	111,90 ± 3,31	106,42 ± 5,88
Metanol	88,83 ± 3,50	54,96 ± 5,66
Metanol-Voda	106,20 ± 5,93	85,72 ± 0,41
Etanol-Metanol-Aceton	66,70 ± 5,51	49,39 ± 3,50
Etanol-Metanol-Aceton-Voda	107,95 ± 1,10	134,87 ± 2,26

Iz Tablice 1. vidljivo je da su vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola od 22,89 do 134,87 mg/g ovisno o primijenjenom ekstrakcijskom otapalu u postupku maceracije. Primjenom otapala etanol-metanol-aceton-voda postiže se najveći ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih fenola, dok primjenom acetona najniži. U postupku ekstrakcije refluksiranjem pri temperaturi ključanja otapala, maseni udjeli ukupnih fenola kreću se od 35,82 do 114,70 mg/g ovisno o ekstrakcijskom otapalu, gdje je primjenom otapala etanol-voda ekstrahiran veći maseni udio ukupnih fenola u odnosu na aceton. Usporedimo li dobivene rezultate masenih udjela ukupnih fenola iz oba postupka ekstrakcije, ukupno gledano se primjenom postupka ekstrakcije refluksiranjem su ekstrahirani veći maseni udjeli ukupnih fenola iz lista kadulje u odnosu na maceraciju. Također, primjenom drugih otapala (etanola, acetona, metanola), te uz dodatak vode u postupku ekstrakcije refluksiranjem ekstrahirani su veći maseni udjeli ukupnih fenola u odnosu na maceraciju. Obradom dobivenih rezultata, vidljivo je i kako se ukupni najveći maseni udio ukupnih fenola dobije primjenom otapala etanol-metanol-aceton-voda, a najmanji primjenom 100%-tnog acetona kao otapala, oboje kod postupka maceracije. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da kombinacija otapala te dodatak vode u otapalo doprinosi većem ekstrakcijskom kapacitetu izolacije ukupnih fenola iz lista kadulje, u oba postupka ekstrakcije. Uzmemo li u obzir, vrijeme trajanja ekstrakcije refluksiranjem i maceracije, prednost je na strani ekstrakcije refluksiranjem zbog znatno kraćeg vremena ekstrakcije uz zadovoljavajući prinos.

4.1.2. Hidroksicimetne kiseline



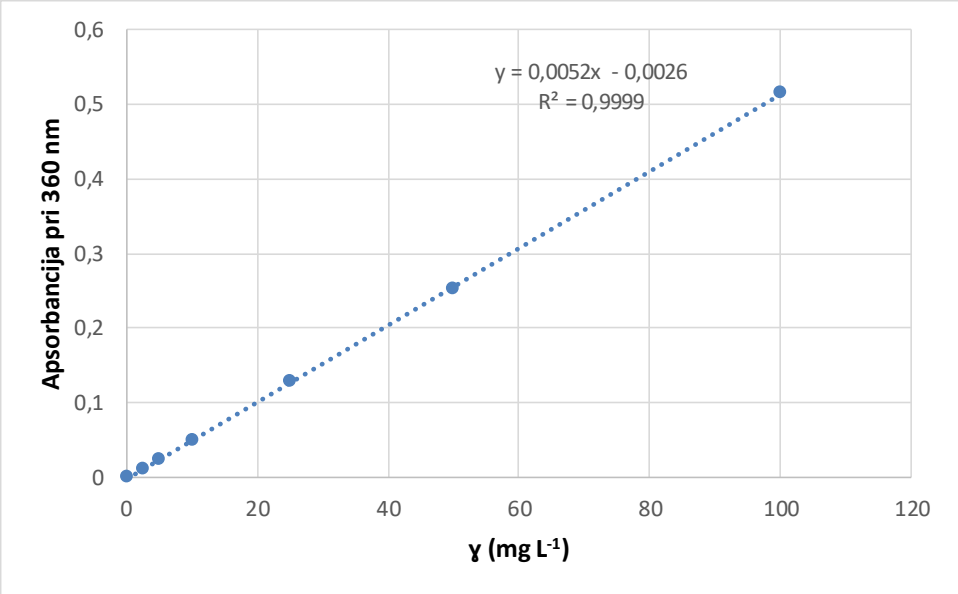
Slika 14. Baždarni dijagram kafeinske kiseline

Tablica 2. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja hidroksicimetnih kiselina dobivenih u oba eksperimenta prilikom uporabe određenog otapala (mg CAE/g ± SD).

OTAPALO	EKSPERIMENT A	EKSPERIMENT B
	w (mg CAE/g) ± SD	
Voda	51,54 ± 0,92	18,02 ± 2,28
Etanol	42,98 ± 1,14	24,68 ± 0,02
Etanol-Voda	49,57 ± 4,15	34,18 ± 5,21
Aceton	27,58 ± 0,5	30,03 ± 1,32
Aceton-Voda	57,38 ± 0,15	41,16 ± 1,64
Metanol	41,62 ± 3,64	28,16 ± 1,64
Metanol-Voda	46,02 ± 6,27	55,61 ± 3,21
Etanol-Metanol-Aceton	42,22 ± 6,68	39,12 ± 3,16
Etanol-Metanol-Aceton-Voda	62,31 ± 1,4	66,08 ± 4,14

Iz Tablice 2. vidljivo je da se maseni udjeli hidroksicimetnih kiselina kreću u rasponu od 27,58 do 62,31 mg/g što ovisi o ekstrakcijskom otapalu koje je primijenjeno u postupku ekstrakcije refluksiranjem. Najveći ekstrakcijski kapacitet izolacije hidroksicimetnih kiselina postiže se primjenom otapala etanol-metanol-aceton-voda, a primjenom vode postiže se najmanji. U drugome postupku, maceraciji, dobivene vrijednosti masenih udjela hidroksicimetnih kiselina su od 18,02 do 66,08 mg/g što također ovisi o odabranom ekstrakcijskom otapalu. Najveći maseni udio hidroksicimetnih kiselina ekstrahira se primjenom otapala etanol-metanol-aceton-voda, dok se primjenom vode ekstrahira najmanji. Dobiveni rezultati spektrofotometrijskog određivanja hidroksicimetnih kiselina pokazuju da se postupkom maceracije s etanol-metanol-aceton-voda otapalom postiže ukupno najveći maseni udio hidroksicimetnih kiselina, dok uporabom vode kao otapala najmanji. Usporedbom dobivenih rezultata za oba provedena postupka, vidljivo je da iako postupak ekstrakcije refluksiranjem ne daje najveću ekstrahiranu vrijednost masenih udjela hidroksicimetnih kiselina, primjena gotovo svih otapala u tom postupku daje veće vrijednosti masenih udjela u odnosu na maceraciju. Otapala etanol-voda, metanol-voda i aceton-voda daju bolje rezultate u pogledu količine ekstrahiranih hidroksicimetnih kiselina, kao dokazanih antioksidansa, u odnosu na primjenu čistog otapala (96% etanol, 100% metanol, 100% aceton). Stoga, može se zaključiti da dodatak vode u otapalo doprinosi većem ekstrakcijskom kapacitetu izolacije hidroksicimetnih kiselina bez obzira o kojem se postupku radilo.

4.1.3. Flavonoli



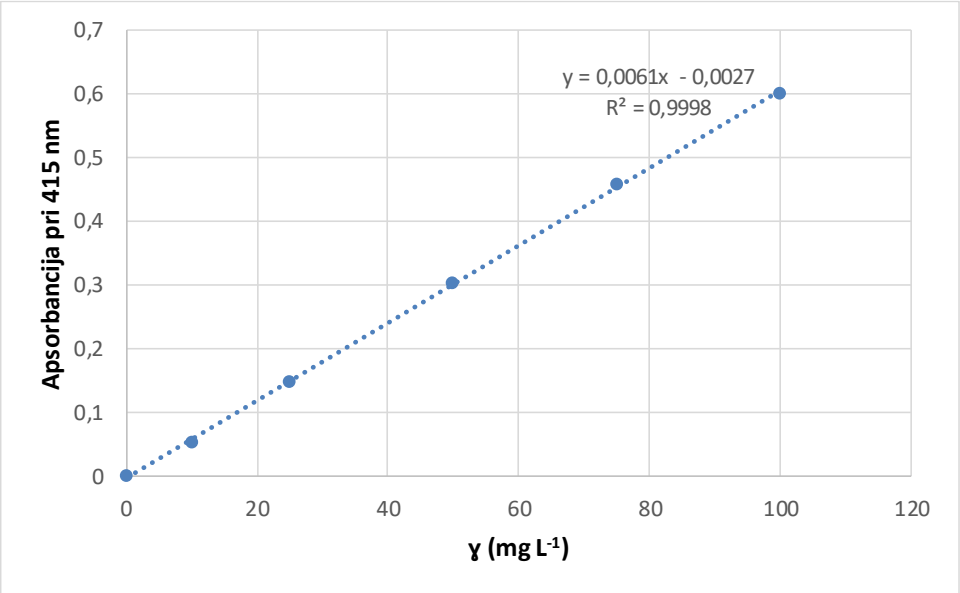
Slika 15. Baždarni dijagram kvercetina

Tablica 3. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonola dobivenih u oba eksperimenta prilikom uporabe određenog otapala (mg QE/g ± SD).

OTAPALO	EKSPERIMENT A	EKSPERIMENT B
	w (mg QE/g) ± SD	
Voda	33,38 ± 0,55	15,29 ± 2,78
Etanol	35,97 ± 2,76	26,85 ± 1,63
Etanol-Voda	44,52 ± 5,2	24,71 ± 1,43
Aceton	29 ± 5,87	35,3 ± 1,92
Aceton-Voda	47,37 ± 2,6	31,91 ± 0,83
Metanol	31,32 ± 3,59	27,69 ± 0,93
Metanol-Voda	33,52 ± 6,67	39,5 ± 0,15
Etanol-Metanol-Aceton	37,59 ± 3,5	30,46 ± 0,48
Etanol-Metanol-Aceton-Voda	48,53 ± 0,8	49,36 ± 3,68

Iz Tablice 3. može se uočiti da je raspon vrijednosti masenih udjela flavonola za postupak ekstrakcije refluksiranjem od 29 do 48,53 mg/g. U postupku maceracije je raspon ekstrahiranih masenih udjela nešto veći i on se kreće između 15,29 i 49,36 mg/g. Ukupno gledajući, visok ekstrakcijski kapacitet etanol-metanol-aceton-voda otapala još jednom dokazuje činjenica da se postupkom maceracije uz navedeno otapalo dobije i ukupno najveći maseni udio flavonola. Suprotno tome, aceton se ponovno pokazao kao otapalo niskog ekstrakcijskog kapaciteta budući da se uporabom istog u postupku maceracije dobije ukupno najmanji maseni udio flavonola. Pojedinačno, kod postupka ekstrakcije refluksiranjem nešto više vrijednosti ekstrahiranih flavonola se dobiju primjenom otapala etanol-metanol-aceton, etanol-metanol-aceton-voda i aceton-voda, dok čistim acetonom vrlo malo. Kod maceracije je utjecaj otapala na ekstrakciju nešto drugačiji obzirom da najmanju količinu ekstrahiranih spojeva daje primjena vode kao otapala. Niske vrijednosti masenih udjela daju i etanol i metanol u čistome obliku, dok se uporaba otapala etanol-metanol-aceton-voda pokazala ponovno učinkovitom. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se veći ekstrakcijski kapacitet izolacije flavonola iz kadulje postiže primjenom smjese otapala (etanol-metanol-aceton-voda) u odnosu na primjenu otapala s većim udjelom organske faze (96%-tni etanol, 100%-tni aceton i 100%-tni metanol) pri obje metode ekstrakcije.

4.1.4. Ukupni flavonoidi



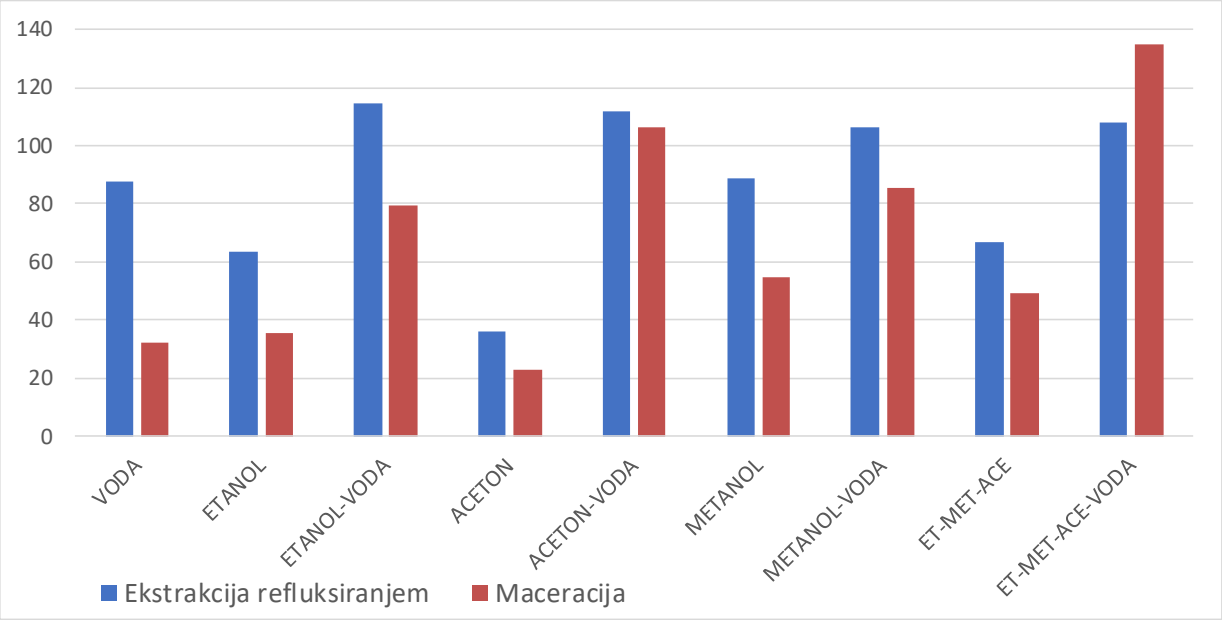
Slika 16. Baždarni dijagram kvercetina

Tablica 4. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida dobivenih u oba eksperimenta prilikom uporabe određenog otapala (mg QE/g ± SD).

OTAPALO	EKSPERIMENT A	EKSPERIMENT B
	w (mg QE/g) ± SD	
Voda	30,49 ± 0,48	11,29 ± 1,49
Etanol	48,31 ± 4,01	26,06 ± 0,19
Etanol-Voda	42,70 ± 2,51	17,49 ± 0,24
Aceton	19,38 ± 5,14	16,45 ± 2,71
Aceton-Voda	26,48 ± 2,45	26,75 ± 0,52
Metanol	48,76 ± 6,09	35,74 ± 5,37
Metanol-Voda	34,20 ± 1,51	24,30 ± 0,03
Etanol-Metanol-Aceton	34,61 ± 5,29	34,65 ± 1,17
Etanol-Metanol-Aceton-Voda	30,67 ± 3,21	26,16 ± 2,96

Iz Tablice 4. vidljivo je da su vrijednosti masenih udjela ukupnih flavonoida od 19,38 do 48,76 mg/g ovisno o primijenjenom ekstrakcijskom otapalu u postupku ekstrakcije refluksiranjem. Zanimljivo je uočiti da se u tom postupku, primjenom metanola (100%), postiže najveći ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih flavonoida, dok primjenom acetona najniži. U postupku maceracije maseni udjeli ukupnih flavonoida se kreću od 11,29 do 35,74 mg/g što naravno ovisi o odabiru ekstrakcijskog otapala. I u ovome postupku, primjena metanola kao otapala doprinosi ekstrakciji najvećeg masenog udjela ukupnih flavonoida. Najniži ekstrakcijski kapacitet izolacije pokazala je voda. Usporede li se dobiveni rezultati masenih udjela ukupnih flavonoida iz oba postupka ekstrakcije, vidljivo je da su primjenom postupka ekstrakcije refluksiranjem ekstrahirani veći maseni udjeli ukupnih flavonoida iz lista kadulje u odnosu na maceraciju. Osim metanola, etanol se također pokazao kao otapalo visokog ekstrakcijskog kapaciteta u oba postupka ekstrakcije ukupnih flavonoida. Primjena kombiniranih otapala kao što su etanol-metanol-aceton i etanol-metanol-aceton-voda i dalje daje dobre rezultate iz čega se može zaključiti da se binarnim sustavom otapala postiže učinkovitija ekstrakcija fenolnih spojeva nego s mono sustavima (u ovom slučaju voda), osim za ukupne flavonoide gdje se bolji rezultat postiže primjenom čistih otapala (metanol i etanol).

4.1.5. Usporedba provedenih eksperimenata



Slika 17. Prikaz utjecaja različitih otapala i metoda ekstrakcije na maseni udio ukupnih fenola (mg GAE g^{-1} suhog lista kadulje)

U provedenome istraživanju ispitivan je utjecaj različitih otapala na ekstrakciju fenolnih spojeva iz sušene kadulje (*Salvia officinalis* L). Klasična ekstrakcija refluksiranjem fenolnih spojeva provedena je primjenom otapala različite polarnosti: voda, etanol (96%), etanol-voda (1:1), aceton (100%), aceton-voda (1:1), metanol (100%), metanol-voda (1:1), etanol-metanol-aceton (1:1:1) i etanol-metanol-aceton-voda (1:1:1:1). Općenito, svi dobiveni ekstrakti bogat su izvor fenolnih spojeva, ali njihova koncentracija značajno ovisi o uvjetima ekstrakcije, polarnosti otapala, vremenu i temperaturi ekstrakcije. Na ekstrakcijski kapacitet osim odabira ekstrakcijskog otapala utječe i kemijski sastav uzorka. Također, prisustvo i udio vode u organskoj fazi otapala ima značajnu ulogu, jer voda pojačava proces difuzije i olakšava ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala.

Iz Slike 17. vidljiv je utjecaj različitih otapala, korištenih u eksperimentima, na ekstrakciju određene masenog udjela ukupnih fenola. U većini slučajeva, primjenom odabranog otapala dobije se veća koncentracija ukupnih fenola postupkom ekstrakcije refluksiranjem u odnosu na maceraciju. Međutim, najveća dobivena koncentracija ukupnih fenola u iznosu od 134,87 mg g^{-1}, dobivena je upravo postupkom maceracije prilikom korištenja otapala etanol-metanol-aceton-voda. Mnoga istraživanja pokazuju utjecaj različitih otapala na ekstrakciju fenolnih spojeva. Areias i sur. (2000) su proveli istraživanje u kojem su ispitivali utjecaj vodene otopine etanola s različitim udjelom organske faze u otapalu (30-80%), na ekstrakciju. Naposljetku su došli do zaključka da na količinu ekstrahiranih fenolnih spojeva veći utjecaj ima udio vode odnosno organske faze u otapalu od izbora samoga otapala što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovome radu koji pokazuju da se bolji ekstrakcijski kapacitet postiže primjenom binarnog sustava otapala tj. vodenih otopina etanola, metanola i acetona, ali s porastom udjela organskih otapala u vodenim otopinama ekstrakcijski kapacitet se smanjuje.

O utjecaju polarnosti otapala na ekstrakciju fenolnih spojeva svjedoče i istraživanja drugih autora (Naczk i Shahidi, 2006), gdje dobiveni rezultati pokazuju kako se povećanjem udjela etanola sa 30 na 50% povećava ekstrakcijski kapacitet, a daljnjim povećanjem udjela etanola, smanjuje se koncentracija ukupnih fenola. Wang i sur. (2004) su istraživali utjecaj otapala na količinu ekstrahiranih fenolnih spojeva. Najveći ekstrakcijski kapacitet su postigli primjenom 30-60 % vodenih otopina etanola, dok primjena drugih otapala (30 % vodenih otopina metanola, acetona i acetonitrila) nije imala značajni utjecaj.

Fecka i Turek (2008) su proveli ekstrakciju fenolnih spojeva iz timjana i mažurana (30, 50 i 70 %) vodenom otopinom metanola te također zaključili da je količina ekstrahiranih fenolnih spojeva značajno ovisila o udjelu vodene faze u otapalu. Povećanje udjela acetona u otapalu za ekstrakciju ne utječe značajno na povećanje ekstrakcijskog kapaciteta. Budući da su polifenoli u biljnim tkivima često vezani na proteine vodikovim i hidrofobnim vezama, potrebno je otapalo za ekstrakciju sa sposobnosti cijepanja tih veza. Upravo zbog toga, učinak ekstrakcije vodenim otapalom manji je nego primjenom organskih otapala.

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju pokazuju da količina ukupnih fenola značajno varira ovisno o koncentraciji etanola, metanola i acetona u otapalu za ekstrakciju, što je u skladu s istraživanjima drugih autora prema kojima ekstrakcijski kapacitet fenolnih spojeva u raznim biljnim vrstama ovisi o vrsti otapala (Akowuah i sur., 2005; Turkmen, Sari, i Velioglu, 2006).

Iz navedenih rezultata može se zaključiti da se binarnim sustavom otapala postiže učinkovitija ekstrakcija fenolnih spojeva nego s mono sustavima (voda ili čisti etanol/metanol) te da udio vodene faze u otapalu ima značajni utjecaj.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih u okviru provedenog istraživanja može se zaključiti slijedeće:

1. Ekstrakti lista kadulje (*Salvia officinalis* L.) bogat su izvor polifenolnih spojeva, spektrofotometrijski su određeni visoki maseni udjeli ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina, flavonola i flavonoida.

2. Najveći ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonola postignut je primjenom otapala etanol-metanol-aceton-voda, maceracijom, dok flavonoida primjenom otapala metanol i etanol, ekstrakcijom refluksiranjem.

3. Kombinacija otapala te dodatak vode u otapalo doprinosi većem ekstrakcijskom kapacitetu izolacije polifenolnih spojeva (ukupnih fenola, hidroksicimetnih kiselina i flavonola) iz lista kadulje kod obje metode ekstrakcije.

4. Maseni udio polifenolnih spojeva u vodenim ekstraktima značajno je manji u usporedbi s masenim udjelima u etanolnim, metanolnim i acetonskim ekstraktima (u kombinaciji s vodom) kod obje metode ekstrakcije.

5. Usporedbom dobivenih rezultata obje metode ekstrakcije, može se zaključiti da metodom ekstrakcije refluksiranjem se postiže veći ekstrakcijski kapacitet izolacije polifenolnih spojeva kroz znatno kraće vrijeme u odnosu na maceraciju, osim za otapalo etanol-metanol-aceton-voda.

6. LITERATURA

Areias F.M., Valentão P., Andrade P.B., Ferreres F., Seabra R.M. (2000) Flavonoids and phenolic acids of sage: influence of some agricultural factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48:** 6081-6084.

Azmir J., Zaidul I.S.M., Rahman M.M., Sharif K.M., Mohamed A., Sahena F., Jahuru M.H.A., Ghafoor K., Norulaini N.A.N., Omar A.K.M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, **117**: 426-436

Bartnick D.D., Mohlerm C.M., Houlihan M. (2006) Methods for the production of food grade extracts. *United States Patent Application*, 20060088627.

Bouaziz M., Yangui T., Sayadi S., Dhouib A. (2009) Disinfectant properties of essential oils from Salvia officinalis L. cultivated in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology* **47:** 2755-2760.

Bravo L. (1998) Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, **56:** 317-333.

Bubalo D., Matijaš J., Dvornik Gosaić J., Svečnjak L., Hegić G. (2010) Praćenje oprašivača na kadulji (Salvia officinalis L.). U: Marić S., Lončarić Z., Florijančić T., Lužaić R., ur., Zbornik radova 45. hrvatskog i 5. međunarodnog simpozija agronoma, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, str. 177-178.

Dai J., Mumper R.J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Pharmacy* **15:** 7313-7352.

Deans S. G., Ritchie G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology* **5:** 165-180.

Dent M., Dragović-Uzelac V., Penić M., Brnčić M., Bosiljkov T., Levaj B. (2013) The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis L.*) Extracts. *Food Technology and Biotechnology* **51:** 84–91.

Dent M., Dragović-Uzelac V., Elez Garofulić I., Bosiljkov T., Ježek D., Brnčić M. (2015) Comparison of Conventional and Ultrasound-assisted Extraction Techniques on Mass Fraction of Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis* L.),*Chem. Biochem. Eng. Q.* **29:** 475–484.

Dragland S., Senoo H., Wake K., Holte K., Blomhoff R. (2003) Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *The Journal of Nutrition* **133:** 1286-1290.

Dragović-Uzelac V., Elez Grofulić I., Jukić M., Penić M., Dent M. (2012) Theinfluence of Microwave-assisted extraction on the isolation of sage (*Salvia officinalis L.*) polyphenols. *Food Technology and Biotechnology* **50:** 377-383.

Drew B.T, Sytsma K.J (2012) Phylogenetics, biogeography and staminal evolution in the tribe *Mentheae* (*Lamiaceae*). *American Journal of Botany* **9:** 933-953.

Dweck A.C. (2000) The folklore and cosmetic use of various Salvia species. Sage: The Genus Salvia, Harwood Academic Publishers, The Netherlands, str. 1-25.

Fecka I., Turek S. (2008) Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry* **108:** 1039-1053.

Fruhbeck G. (1996) Flavonoid intake and coronary mortality. *British Medical Journal* **312:** 1479.

Gao K., Henning S.M., Niu Y., Youssefian A.A,. Seeram N.P., Xu A., Heber D. (2005) The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* **17:** 89–95.

Generalić I., Skroza D., Ljubenkov I., Katalinić A., Burčul F., Katalinić, V. (2011) Influence of the phenophase on the phenolic profile and antioxidant properties of Dalmatian sage. *Food Chemistry* **127:**427-433.

Generalić I., Skroza D., Šurjak J., Možina S.S., Ljubenkov I., Katalinić A., Katalinić, V. (2012) Seasonal variations of phenolic compounds and biological properties in sage (*Salvia officinalis L.*). *Chemistry & Biodiversity* **9:**441-457.

Ghorbani A., Esmaeilizadeh E. (2016) Pharmacological properties of Salvia officinalis and its components. *Journal of Traditional and Complementary Medicine.* **4:** 433 - 440.

Greguraš D. (2013) Genetic diversity and population structure of Dalmatian sage (*Salvia officinalis L.).* - Dissertation, Faculty of Agriculture, University of Zagreb.

Halliwell B., Aruoma O. I., Eds., DNA and Free Radicals, Ellis-Horwood, Chichester, 1993.

Harborne J. B., Baxter H., Moss G. P. (1999) Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants, 2. izd., Taylor & Francis, London.

Harborne J. B. (1988) The flavonoids: recent advances. U: Plant Pigments, Goodwin T.W., ur., Academic Press, London, UK, str. 299-343.

Jantol N., Kekić T. (2013) Analiza raznolikosti kloroplastne DNA i filogeografija ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.) Rad za Rektorovu nagradu, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, str. 70.

Katalinić V., Miloš M., Jukić M. (2006) Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, **94:** 550-557.

Kliebenstein D. J., Osboum A.(2012) Making new moleculs-evolution of pathway for novel metabolites in plants. *Current Option in Plant* Biology **15:**415-423.

Kušan F. (1941) Kadulja, Salvia officinalis L. Vjesnik ljekarnika, Zagreb**15:** 374-376, 16: 407-416, 17: 448-450, 18: 483-487

Kuštrak D. (2005) Farmakognozija-fitofarmacija, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, str. 270-290.

Lu Y., Foo L.Y. (2000) Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* **55:** 263-267.

Ma Y.Q., Chen J.C., Liu D.H., Ye X.Q. (2009) Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry* **16:** 57-62.

Macheix J.J, Fleuriet A., Billot J. (1990) Fruit Phenolics. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, USA, str. 101–126.

Miller A.L. (1996) Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. *Alternative Medicine Review* **1:** 103-111.

Miller N.J., Ruiz-Larrea M.B. (2002) Flavonoids and Other Plant Phenols in the Diet: Their Significance as Antioxidants. *Journal of Nutrition & Enviromental Medicine* **12:** 39-51.

Miralai S., Khan M.M., Islam M.R. (2007) Replacing artificial additives with natural alternatives. Journal of Natural Science and Engineering **1:** 403-434.

Nikolić T., ur. (2015) Flora Croatica baza podataka, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (datum pristupa:06.09.2018).

Owades J. L., Rubin G., Brenner M. W. (1958) Determination of tannins in beer and brewing materials by ultraviolet spectrophotometry. *American Society Brewing Chemistry, Proceedings*, str. 66-74.

Pandey K.B., Rizvi S.I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2:** 270-278.

Petersen M., Simmonds M. S. J. (2003) Rosmarinic acid. *Phytochemistry* **62:**121– 125.

Ralph J., Quideau S., Grabber J.H., Hatfield R.D. (1994) Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell-walls. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions **1:** 3485- 3498.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* **20:** 933-956.

Ristić M.S., Brkić D.D., Nastovski T.Lj. (1999) Hemijski sastav etarskog ulja žalfije. U: Žalfija (Salvia officinalis L.), Brkić D., ur., Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", Beograd i Art Grafik, Beograd, Srbija, str. 29-42.

Robards K., Antolovich M. (1997) Analytical chemistry of frit bioflavonoids-a review. *Analyst* **122:** 11R–34R.

Robards K., Prenzler P.D., Tucke G., Swatsitang P., Glover W. (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* **66:** 401-436.

Russell W.R., Labat A., Scobbie L., Duncan G.J., Duthie G.G. (2009) Phenolic acid content of fruits commonly consumed and locally produced in Scotland. *Food Chemistry* **115:**100–104.

Russo A., Acquaviva R., Campisi A., Sorrenti V., Di Giacomo C., Virgata G., Barcellona M.L., Vanella A. (2000) Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biology and Toxicology* **16:** 91-98.

Scalbert A., Williamson G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* **130:** 2073-2085.

Scalbert A., Johnson I.T., Saltmarsh M. (2005) Polyphenols: antioxidants and beyond. The American Journal of Clinical Nutrition **81:** 2155-2175.

Schuster B., Hermann K. (1985) Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivates in soft fruits. *Phytochemistry* **24:** 2761-2764.

Shapiro S., Meier A., Guggenheim B. (1994) The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiology &Immunology* **9:** 202–208.

Spanos G.A., Wrolstad R.E. (1992) Phenolics of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage – A Review. *Journal of Agricultural &Food Chemistry* **40:** 1478- 1487.

Strack D. (1997) Phenolic metabolism. U: Plant Biochemistry, Dey P.M., Harborne J.B., ur., Academic Press, London, UK, str. 387-416.

Sutton J. (2004) The Gardener's Guide to Growing Salvias. Workman Publishing Company. str. 121.

Takeuchi T., Pereira C., Braga M., Maróstica M., Leal P., and Meireles M. (2009) Low-pressure solvent extraction (solid–liquid extraction, microwave assisted and ultrasound assisted) from condimentary plants. In M. A. A. Meireles (Ed.), Extracting bioactive compounds for food products - Theory and applications, Boca Raton: CRC Press str. 140–144.

Tamas M., Fagarasan E., Ionescu C. (1986) Phytochemical study of *Salviae folium*. *Farmacia (Bucharest)* **34:** 181-186.

Trinajstić I. (1992) Endemi hrvatske flore: Ljekovita kadulja – *Salvia officinalis L.*, endemična, ljekovita, medonosna i ukrasna biljka. Priroda 9 – 10, str. 34-36.

Tsao R. (2010) Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, *Nutrients*, **2:** 1231-1246
Kametou P., Viljoen A., Steenkamp P. (2010) Antioxidant, anti-inflammatory activities and HPLC analysis of South African Salvia species. *Food Chemistry***119:** 684-688.

Umeljić V. (2004) Atlas medonosnog bilja: U svijetu cvijeća i pčela. 1. dio. Split: Borkolić Ilija, Sinj, str. 206-207.

Vladimir S. (1993) Izolacija i karakterizacija biološki aktivnih spojeva timijanolisnog vrisića – Micromeria thymifolia (Scop.) Fritsch. Magistarski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, str. 8, 20-30.

Vladimir-Knežević S. (2008) Farmakognozija I, Prirodni fenolni spojevi. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, str. 9-14.

Vuković R. (2013) Učinak inducibilne ekspresije gena crypt na sintezu fenolnih spojeva i antioksidacijski status transgenog korijenja ukrasne koprive (Coleus blumei Beuth.). Doktorski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek

Walker J.B, Sytsma K.J, Treutlein J, Wink M. (2004) *Salvia* (*Lamiaceae*) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe *Mentheae*. *American Journal of Botany* **91:** 1115-1125.

Wang M., Li J., Rangarajan M., Shao Y., Lavoie E. J., Huang, T.C., Ho C.T. (1998) Antioxidative phenolic compounds from sage (Salvia officinalis). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46:** 4869-4873.

Wang H., Provan G.J., Helliwel K. (2004) Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chemistry* **87:** 307-311.

Willfort R. (2002) Ljekovito bilje i njegova upotreba, Erudit Zagreb, Zagreb, str. 606.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

ime i prezime studenta